



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA



BASES FARMACOCINÉTICAS Y
ESTUDIOS PRECLÍNICOS

DRA. INÈS FUENTES NORIEGA
LAB 112, EDIF. "E", FACULTAD DE QUÍMICA
ifuentes@unam.mx

Contenido de la Presentación

1. Historia
2. Ciclo de vida de un fármaco
3. Estudios Farmacocinéticos, importancia y conceptos
4. Desarrollo de nuevos fármacos. Concepción, Fase preclínica
Fase Clínica, intercambiabilidad Genérica
5. Estudios Preclínicos
6. Clasificación Biofarmacéutica

Historia. Desarrollo de Fármacos



CALIDAD DE LOS PRODUCTOS

Siglo IV AC. Teofrasto: calidad de los agentes medicinales está relacionada con el origen, variedad, edad y porción de la planta utilizada, así como de su conservación y almacenamiento

Pure Food and Drug Act - 1906

- FDA
- Fármacos deben pasar estándares de potencia y pureza.
- La FDA tiene que verificar que el etiquetado no sea falso ni engañoso.
- La FDA tiene que vigilar que la adulteración de productos no ocurra.

Since 1906...



The Dining Room of 'The Poison Squad'

FDA



CALIDAD DE LOS PRODUCTOS

1930 – 1940

CALIDAD:

- PUREZA
- POTENCIA
- CONTENIDO



Elixir de sulfanilamida

- Apariencia
- Sabor
- Fragancia

10% sulfanilamida

72% dietilenglicol

16% agua

Extracto de frambuesa, sacarina, amaranto
y caramelo

No estudios toxicidad

No estudios clínicos



Food Drug and Cosmetic Act (1938)

- Surge a consecuencia de mas de 100 muertes debido a que el elixir de contenía ilegalmente dietilenglicol.
- Esta nueva ley requiere a los patrocinadores demuestren que los productos sean **SEGUROS** antes de entrar al mercado.
- Extiende cobertura del acto de 1906 a cosméticos y aparatos médicos.



Thalidomide “the sleeping pill”



Defectos congénitos

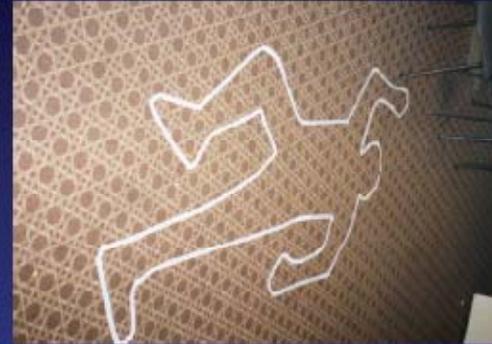
Causados por el uso de la talidomida



Enmienda Kefauver-Harris FD&C Act (1962)

- A consecuencia de los efectos de talidomida en recién nacidos, producto que estaba aprobado en Europa pero no en USA.
- Requiere que los fabricantes demuestren **EFICACIA** antes de vender el producto
- Se requiere **Consentimiento** por escrito de el paciente y/o voluntario antes de suministrar fármacos bajo investigación
- Se requiere que los fabricantes reporten efectos adversos
- Productos aprobados entre 1938 y 1962 basados en seguridad solamente (~4000), fueron re-evaluados en cuanto su eficacia
- Productos en el mercado antes de 1938 fueron denominados “abuelos”.

Tylenol



- Área de Chicago 1982
- 65 mg de cianuro (forma de cianuro de potasio)
- 10,000 veces cantidad necesaria para causar la muerte.

Legislación asociada a tragedias. USA

Tragedia

- 14 niños mueren antitoxina diftérica contaminada con bacilos de tétanos en 1901
- niños mueren por dietilen glicol en el elixir de sulfanilamida in 1936
- Niños contraen polio y/o mueren por vacuna Salk 1955 (virus no inactivado adecuadamente)
- Talidomida, causa severos defectos de nacimiento en miles de niños en Europa occidental en 1962 (10 000 casos)
- Envenenamiento por cianuro vía cápsulas de Tylenol 1982

Legislación

Biological Control Act 1902

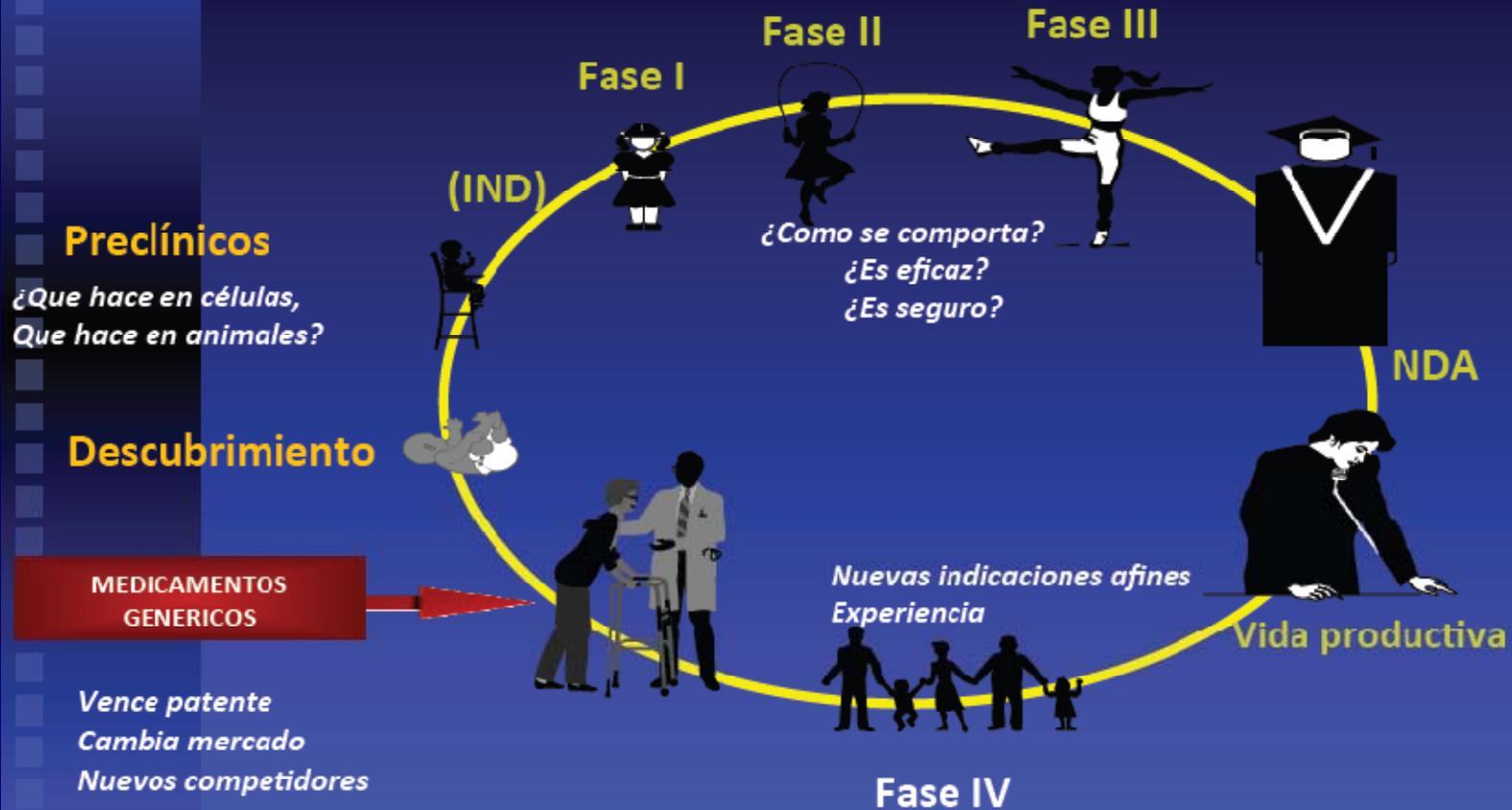
Federal FD&C Act 1938

Division of Biological Standards

Kefauver-Harris Drug Amendments 1962

Federal Anti-Tampering Act 1983

CICLO DE VIDA DE UN FÁRMACO



Drug Price Competition and Patent Term Restoration Act (Waxman-Hatch - 1984)

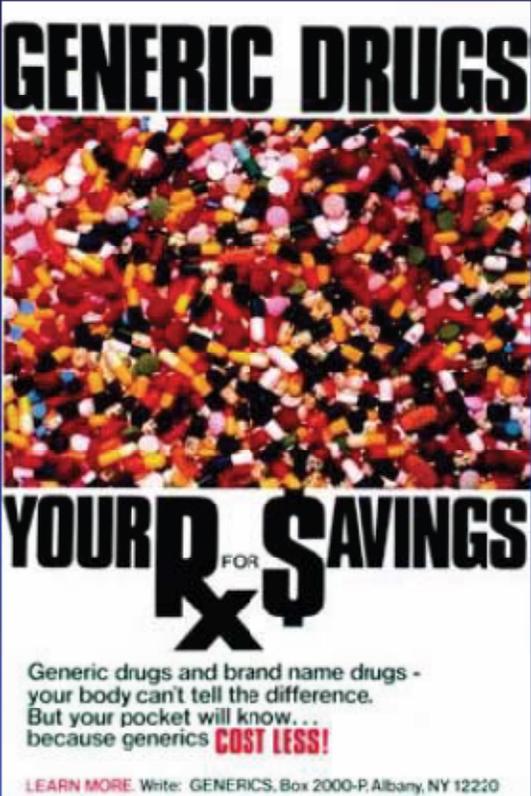
Incentivos para patrocinadores de productos genéricos:

Todo fármaco aprobado puede tener formas genéricas.

No es necesario duplicar estudios clínicos para aprobar genéricos.

Establece un proceso para aprobar genéricos mas rápido.

Establece exclusividad de 180 días para el primer genérico que certifique que la patente del producto original no es valida, o no esta siendo violada y sea aprobado por la agencia.



GENERIC DRUGS

YOUR RX FOR SAVINGS

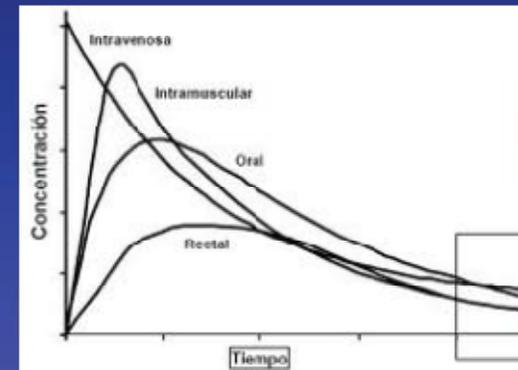
Generic drugs and brand name drugs -
your body can't tell the difference.
But your pocket will know...
because generics **COST LESS!**

LEARN MORE Write: GENERICS, Box 2000-P, Albany, NY 12220

Estudios farmacocinéticos durante la vida de un fármaco

- Preclínicos
- Clínicos
- Farmacovigilancia
- Intercambiabilidad Genérica

Farmacocinética



FARMACOCINÉTICA

Estudia el curso temporal de las **concentraciones** de fármaco y/o metabolitos en fluidos, tejidos y excreciones biológicas y se encarga de elaborar modelos para explicar los datos

Farmacología-Farmacocinética



Concentraciones plasmáticas

Medición de la concentración

1. Fluidos biológicos

- Métodos invasivos: Sangre, líquido cefalorraquídeo, biopsia tejidos
- Métodos no invasivos: Orina, saliva, heces, aire expirado

★ Medición de la concentración en plasma, sangre o suero, es la determinación **más directa** para establecer la farmacocinética de un fármaco en el cuerpo

2. Significancia de medir concentración plasmática

★ La intensidad del efecto farmacológico o tóxico generalmente está relacionado con la **concentración** del fármaco en el sitio receptor.

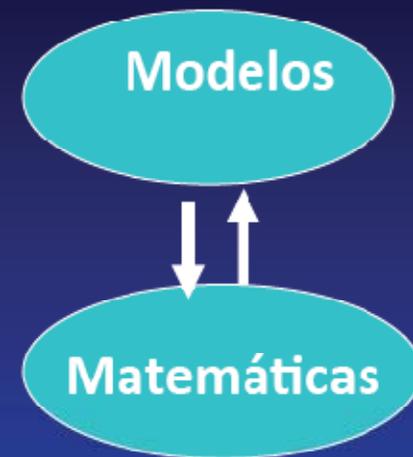
¿Qué es un modelo?

- Modelo: Representación física del sistema que se desea estudiar
- Queremos que sea lo más cercano a nuestro conocimiento, conforme los recursos lo permitan

Farmacocinética

¿qué tipo de modelos?

- Modelo compartimental*
- Modelo estadístico
- Modelo fisiológico
- Farmacocinética poblacional



MODELOS COMPARTIMENTALES

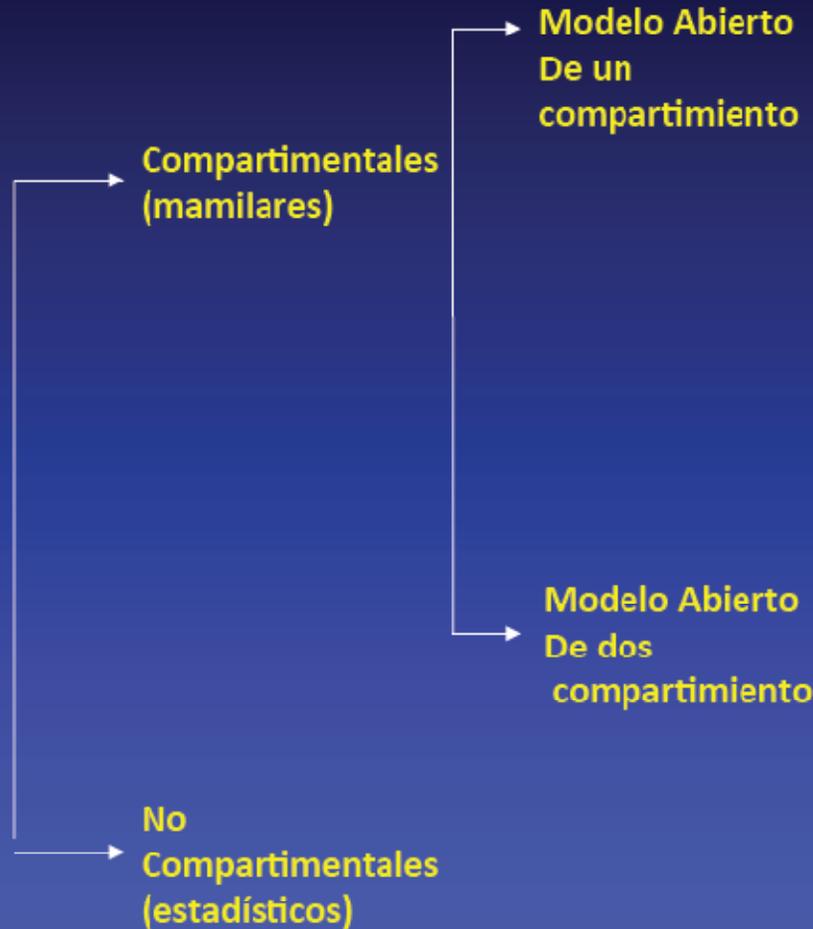
- Compartimiento: fracción de material biológico en el que el fármaco se supone uniformemente distribuido y en el que presenta las mismas propiedades cinéticas.
- Un compartimiento tiende a agrupar zonas orgánicas afines, pero en realidad se trata de un concepto meramente cinético cuya entidad no es necesariamente fisiológica (abarca zonas con constantes cinéticas semejantes)

Modelos compartimentales

- El modelo compartimental
- Depende del proceso de distribución
- Un proceso rápido, equilibrará rápidamente al fármaco entre la circulación y el organismo
- Si el equilibrio entre la sangre y los órganos y tejidos es lento, estos se podrán agrupar en diferentes compartimientos

MODELOS EN FARMACOCINÉTICA

MODELOS EN FARMACOCINÉTICA (Principales)



Administración IV,
datos Plasmáticos

$$C_p = C_p^0 e^{-ket}$$

Administración IV,
datos Urinarios

$$\ln \frac{\Delta A}{\Delta t} = \ln kexAc^0 - ket$$

Administración oral,
datos plasmáticos

$$C_p = \frac{KaFD}{Vd(ka - Ke)} [e^{-ket} - e^{-kat}]$$

Administración oral,
datos urinarios

$$\ln \frac{\Delta A}{\Delta t} = \frac{kexkaFD}{(ka - ke)} [e^{-ket} - e^{-kat}]$$

Administración por
infusión constante,
datos plasmáticos

$$C_p = \frac{Ko}{keVd} (1 - e^{-ket})$$

Administración oral,
datos plasmáticos

$$C_p = Ae^{-\alpha t} - Be^{-\beta t}$$

Administración oral,
datos plasmáticos

$$C_p = A^0 e^{-\alpha t} + B^0 e^{-\beta t} + P^0 e^{-kat}$$

Administración por
infusión constante,
datos plasmáticos

$$C_p = \frac{D(\alpha - K_{21})}{Vc(\alpha - \beta)} \left(\frac{1 - e^{-\alpha t}}{1 - e^{-\alpha t}} \right) e^{-\alpha t} + \frac{D(K_{21} - \beta)}{Vc(\alpha - \beta)} \left(\frac{1 - e^{-\beta t}}{1 - e^{-\beta t}} \right) e^{-\beta t}$$

Procesos lineares y no lineares

- **Lineares:** La velocidad de transferencia es proporcional a la concentración en el compartimiento: Farmacocinética lineal
- **No lineares:** La velocidad de transferencia no es proporcional a la concentración (orden cero, cinética saturable en el metabolismo o en la unión a proteínas): Farmacocinética no lineal

¿Qué podemos aprender de los modelos compartimentales?

- 1) Si encontramos un modelo que describe los datos podemos tener una descripción del mecanismo que genera la información

¿Qué podemos aprender de los modelos compartimentales?

- ☞ Si encontramos un modelo al que se ajustan los datos, podemos calcular algunos parámetros importantes:
 - La distribución del fármaco en el organismo
 - La velocidad de eliminación
 - La velocidad de transferencia y niveles en el estado estacionario
 - La relación entre la concentración plasmática y el tiempo de efecto terapéutico

FARMACOCINETICA

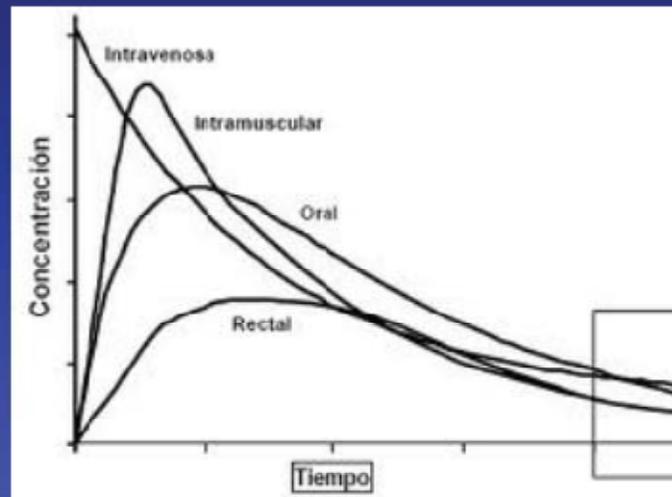
Ventajas y aplicaciones

- Conceptos farmacocinéticos son los mismos para todos los fármacos
- Conociendo estos parámetros, anticipar el régimen óptimo y predecir cambios si se modifica el régimen

FARMACOCINÉTICA

Conceptos

- Tiempo de vida media : “Tiempo necesario para que la concentración de fármaco en el fluido biológico decrezca en un 50%”.

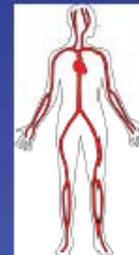
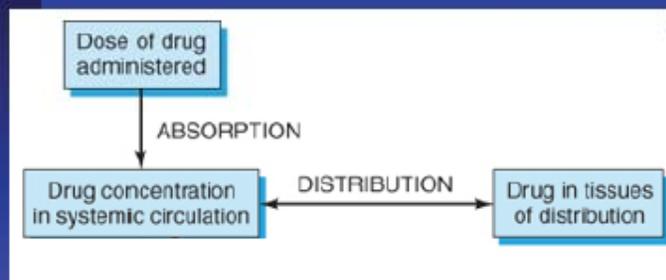


Determinación de k_e  Tiempo de vida media

FARMACOCINÉTICA

Conceptos

- Volumen de Distribución Aparente (V_d): “Representa el volumen acuoso del organismo en el cual es capaz de distribuirse una cantidad determinada de fármaco de acuerdo con sus características fisicoquímicas”.



Factores que influyen en la distribución de fármacos

- 1. Circulación sanguínea y permeabilidad vascular** para alcanzar el sitio de acción
- 2. Lipofilicidad del fármaco** : Fármacos lipofílicos se acumulan en tejido adiposo
- 3. Unión a proteínas plasmáticas:** Fármaco unido no puede atravesar las membranas

Unión a proteínas

Interacción reversible de un fármaco con las proteínas del plasma

F. Libre + **proteína** = complejo F-proteína

- albumina
- α_1 - glicoproteína ácida
- lipoproteínas

Sólo el fármaco libre puede difundir a través de la membrana

FARMACOCINÉTICA

Conceptos

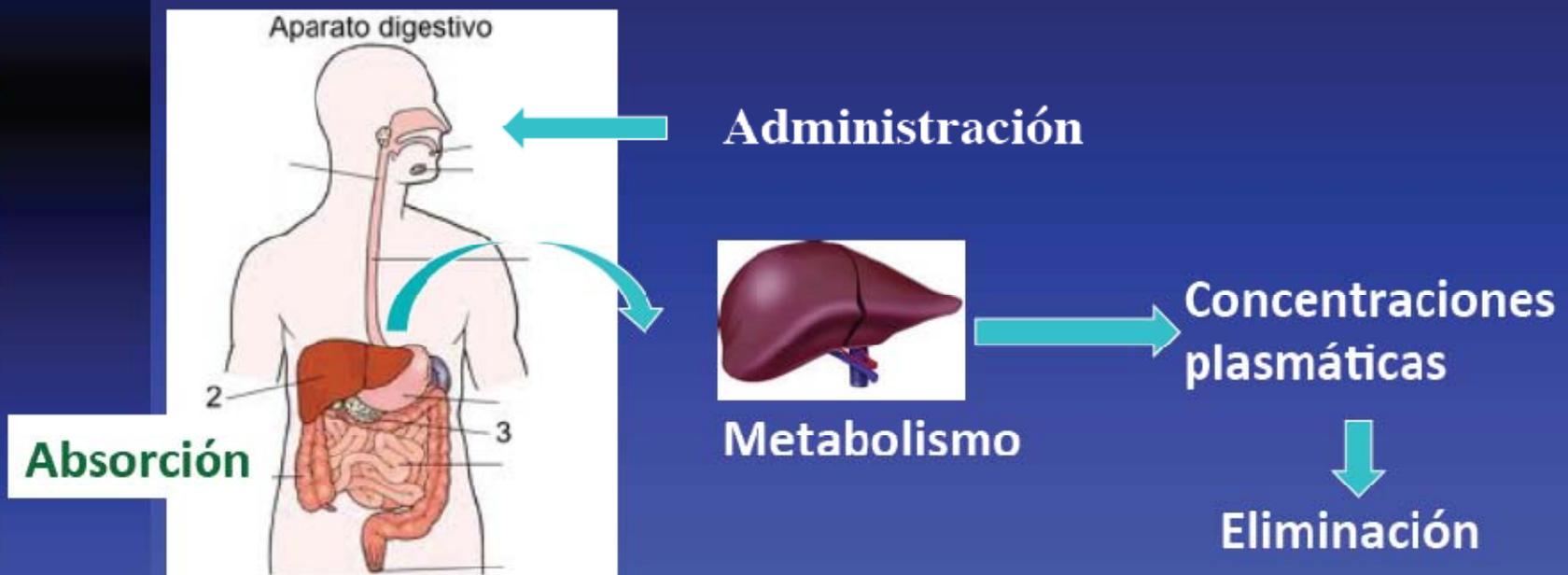
- Depuración (Aclaramiento):
“Volumen de sangre, plasma o suero que es aclarado de fármaco por el organismo en una unidad de tiempo”.

$$Cl = Ke Vd$$

FARMACOCINÉTICA

Conceptos

- Biodisponibilidad (F): “Cantidad de fármaco que llega de forma inalterada a la circulación sistémica y la la velocidad a la cual lo hace”



Biodisponibilidad absoluta (F)

Datos sanguíneos

- $F = \frac{\text{Área bajo la curva extravascular} * \text{Div}}{\text{Área bajo la curva intravenosa} * \text{Dev}}$
- $F = 0$, Nada llegó inalterado a la circulación
- $F = 1$ Todo llegó a la circulación

BIODISPONIBILIDAD RELATIVA

- DATOS SANGUÍNEOS

$$F \text{ relativa} = \frac{\text{ABC prueba}}{\text{ABC referencia}} \times \frac{\text{DOSIS referencia}}{\text{DOSIS prueba}}$$

$C_{\text{máx}}$, $T_{\text{máx}}$

Datos urinarios:

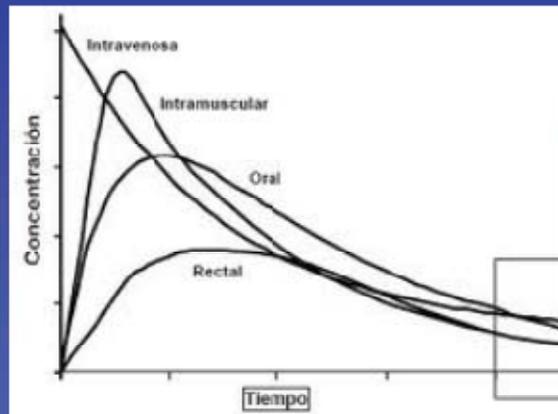
- $F_{\text{rel}} = \frac{A_{\text{ex}\infty} \text{ prueba} * D_{\text{ref}}}{A_{\text{ex}\infty} \text{ referencia} * D_{\text{pr}}}$

- velocidad de excreción máxima,
- tiempo para alcanzar la velocidad de excreción máxima

FARMACOCINÉTICA

Conceptos

- C_{max} : Conc. Máxima observada en plasma
- T_{max} : tiempo al cual se observa la C_{max}
- ABC, área total bajo la curva de concentración-tiempo, desde tiempo cero a infinito
- K_a y K_e son las constantes de absorción y eliminación respectivamente.



FARMACOCINÉTICA

MAUC

Administración IV Datos plasmáticos

$$Cp = Cp^0 * e^{-k_e * t}$$

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{ke}$$

$$Vd = \frac{D}{Cp^0}$$

$$Cl = keVd$$

$$ABC = ABC_0^t + ABC_t^\infty$$

$$ABC = \text{Trapezoides} + \frac{Cp^u}{ke}$$

Administración extravascular (oral) Datos plasmáticos

$$\ln \frac{\Delta A}{\Delta t} = \frac{kexkaFD}{(ka - ke)} [e^{-ket} - e^{kat}]$$

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{ke}$$

$$ABC_0^\infty = \frac{F * D}{Ke * Vd}$$

$$Cl = keVd$$

MODELO ABIERTO DE UN COMPARTIMIENTO

ADMINISTRACIÓN INTRAVENOSA

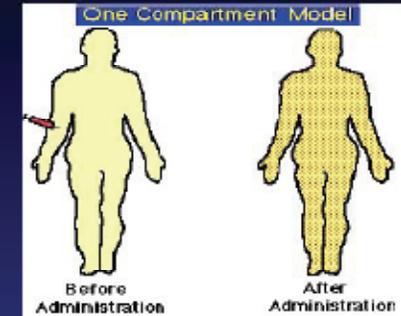
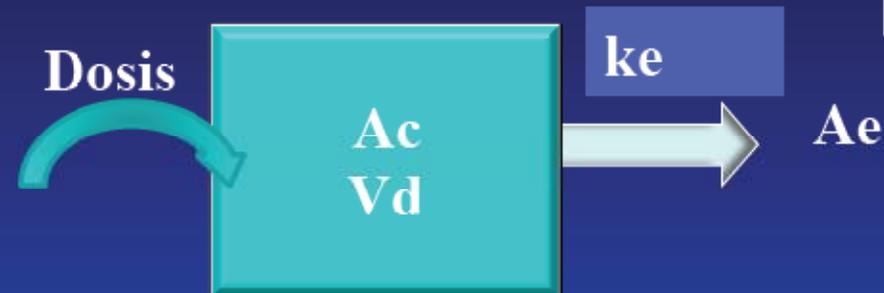
MAUC. IV

SUPUESTOS BASICOS

- Toda la dosis llega inmediatamente a la circulación
- El fármaco se equilibra rápidamente en los compartimientos del organismo
- El fármaco se distribuye homogéneamente en el organismo en un volumen V_d
- El fármaco se elimina mediante un proceso de primer orden y una constante k_e

MAUC IV. ECUACION DE VELOCIDAD

MODELO:

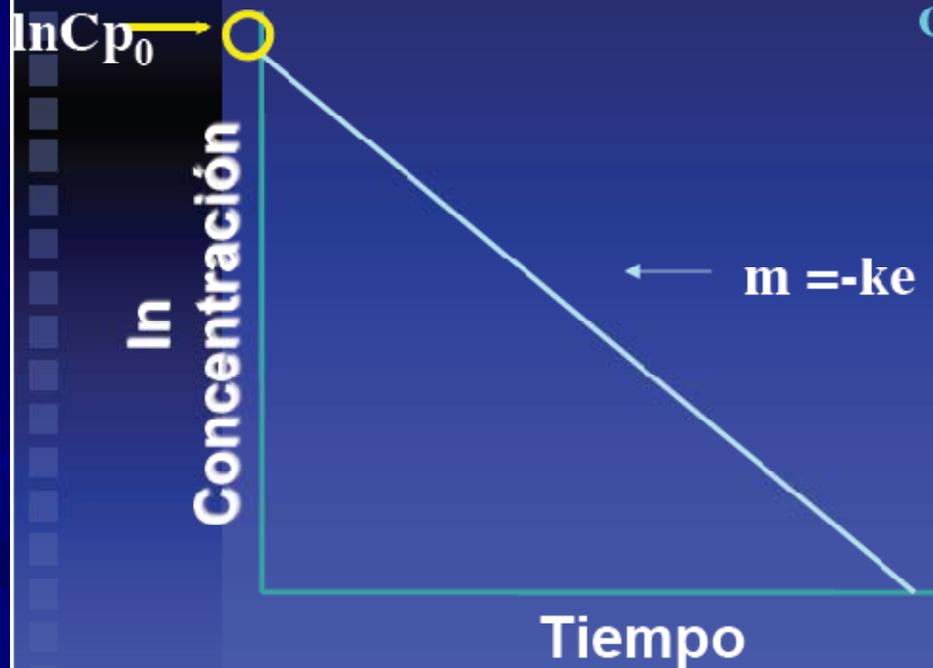


ECUACION QUE DESCRIBE AL MODELO:

$$C_p = C_p^0 e^{-k_e t}$$
$$\ln C_p = \ln C_p^0 - k_e t$$

Linearizando la ecuación

$$\ln C_p = -k_e t + \ln C_p^0$$



PARÁMETROS QUE SE PUEDEN CALCULAR

1) k_e DE LA PENDIENTE

2) $t_{1/2} = 0.693 / k_e$

2) C_p^0 DEL INTERCEPTO

3) $V_d = D/C_p^0$

4) $Cl = k_e V_d$

5) *AREA BAJO LA CURVA:*

Método de los trapecios:

AREA BAJO LA CURVA

$$ABC_0^\infty = ABC_0^t + ABC_t^\infty$$

$$ABC_0^t = \sum ABC$$

$$ABC_0^\infty = \frac{Cp^u}{ke}$$

- En donde: Cp^u = Último dato experimental de concentración plasmática
- ke = Constante de eliminación

Parámetros farmacocinéticos

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{ke}$$

- Tiempo de vida media: “Tiempo necesario para que la concentración de fármaco en el fluido biológico decrezca en un 50%”.

Significado de los parámetros farmacocinéticos

$$Vd = \frac{D}{Cp^0}$$

- Volúmen de distribución (Aparente)
- El valor es un volumen matemático, no fisiológico
- Si el valor es menor a 4L, se dice que se encuentra poco distribuido (se encuentra en plasma)
- Si el valor excede al volumen fisiológico (42 L para una persona de 70 kg) se dice que el fármaco se encuentra ampliamente distribuido
- En los casos en donde Vd es muy grande, esto es indicativo que el fármaco puede encontrarse en tejido adiposo.

Significado de los parámetros farmacocinéticos

$$Cl = Vd * ke$$

Aclaramiento o Depuración

- “Volumen de sangre, plasma o suero que es aclarado de fármaco por el organismo en una unidad de tiempo”
- Un parámetro de eliminación
- Clínica

Pharmacokinetics of Nalidixic Acid in the dog

- Estudio:
- Perros beagle de 15 kg
- Dosis: 10 mg/kg. Administración vía cefálica
- Muestreo: 1, 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 5 y 7 horas
- Método analítico: espectrofotométrico

Bull. Coll. Agr. & Vet. Med., Nihon Univ., No. 42, p. 27~30 (1985).

Pharmacokinetics of Nalidixic Acid in the dog

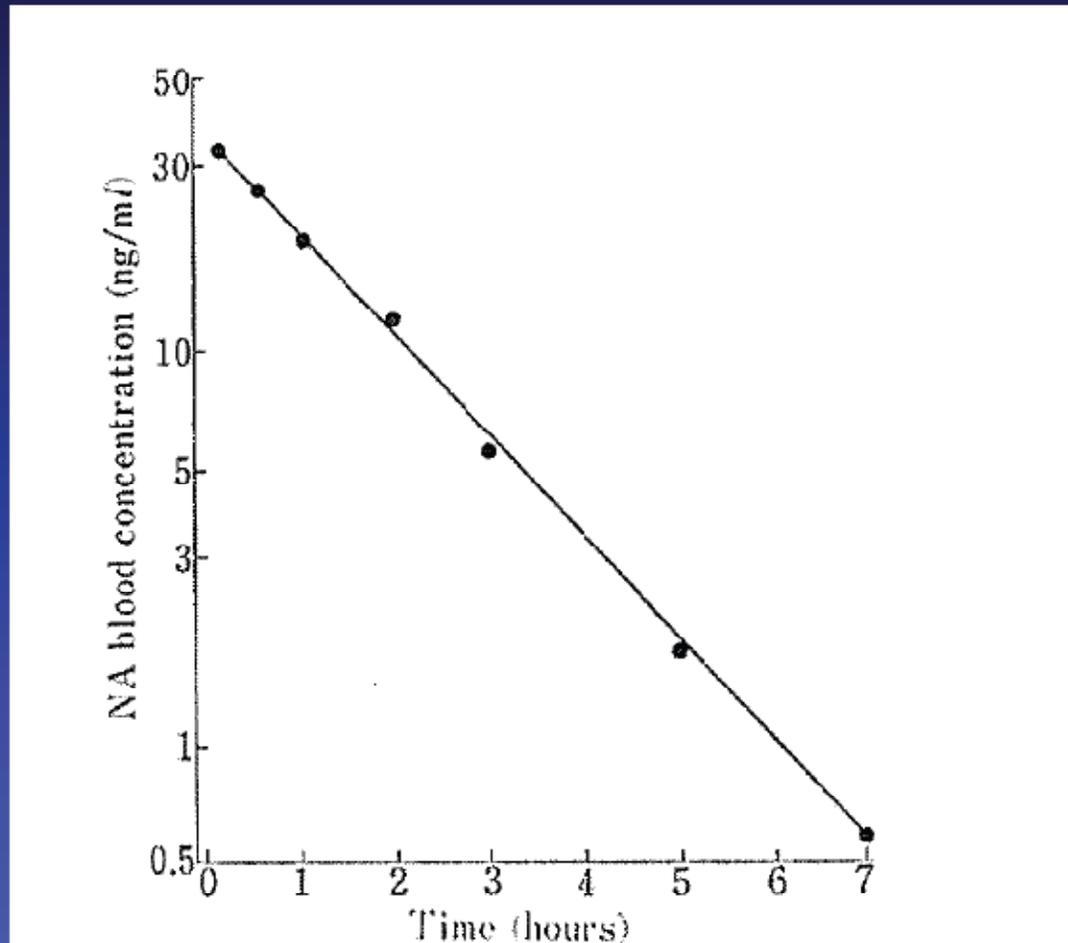
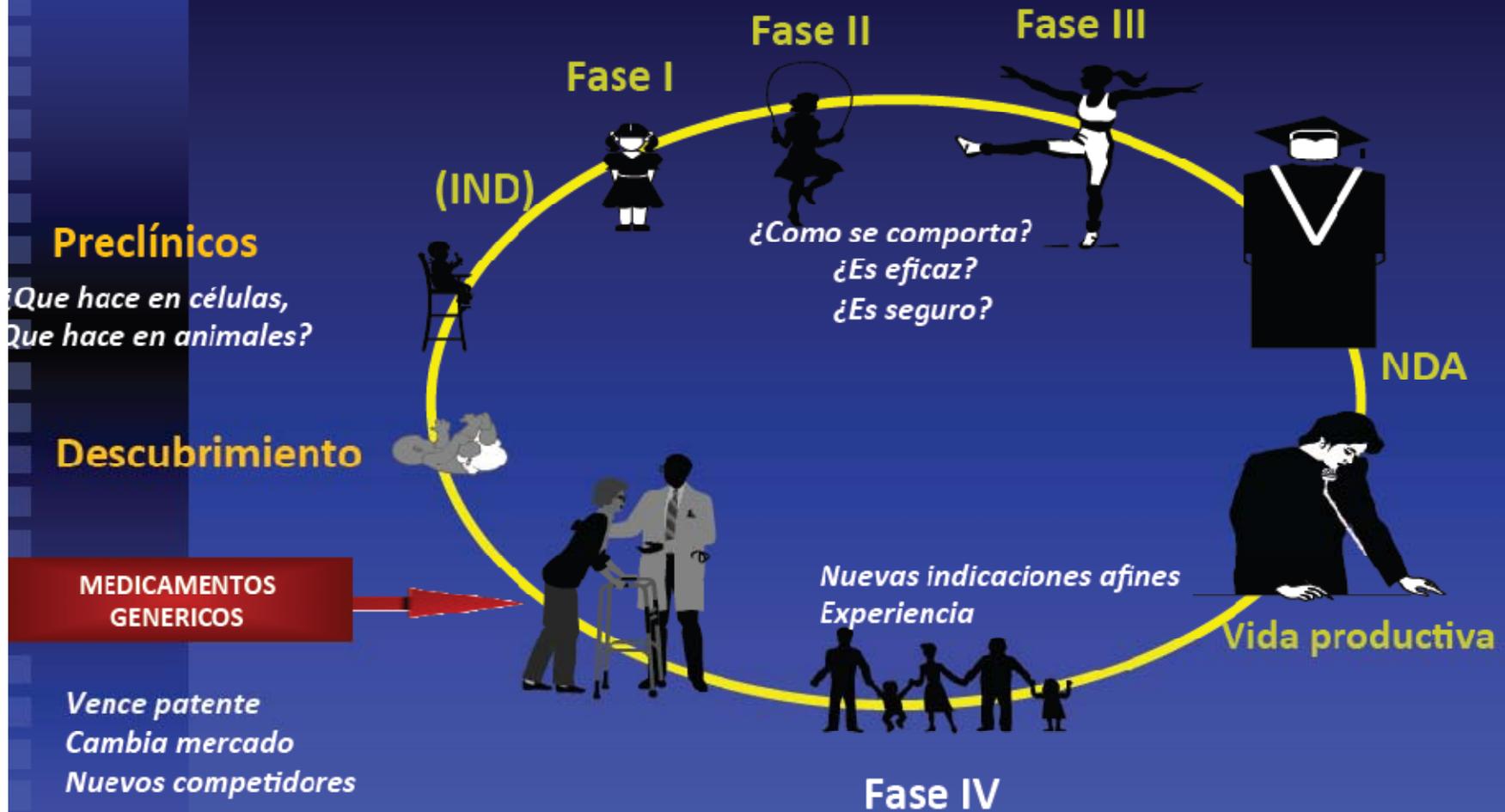


Table 1 Pharmacokinetic parameters and bioavailability after intravenous and oral administration in dogs (Mean \pm SD)

(a) Intravenous administration (10 mg/kg)

C_p^0 (ng/ml)	37.9 \pm 1.9
K_{el} (h)	0.519 \pm 0.092
$t_{1/2}$ (h)	1.37 \pm 0.25
Vd (l/kg)	0.264 \pm 0.035
Cl (ml/kg/h)	0.137 \pm 0.033

CICLO DE VIDA DE UN FÁRMACO

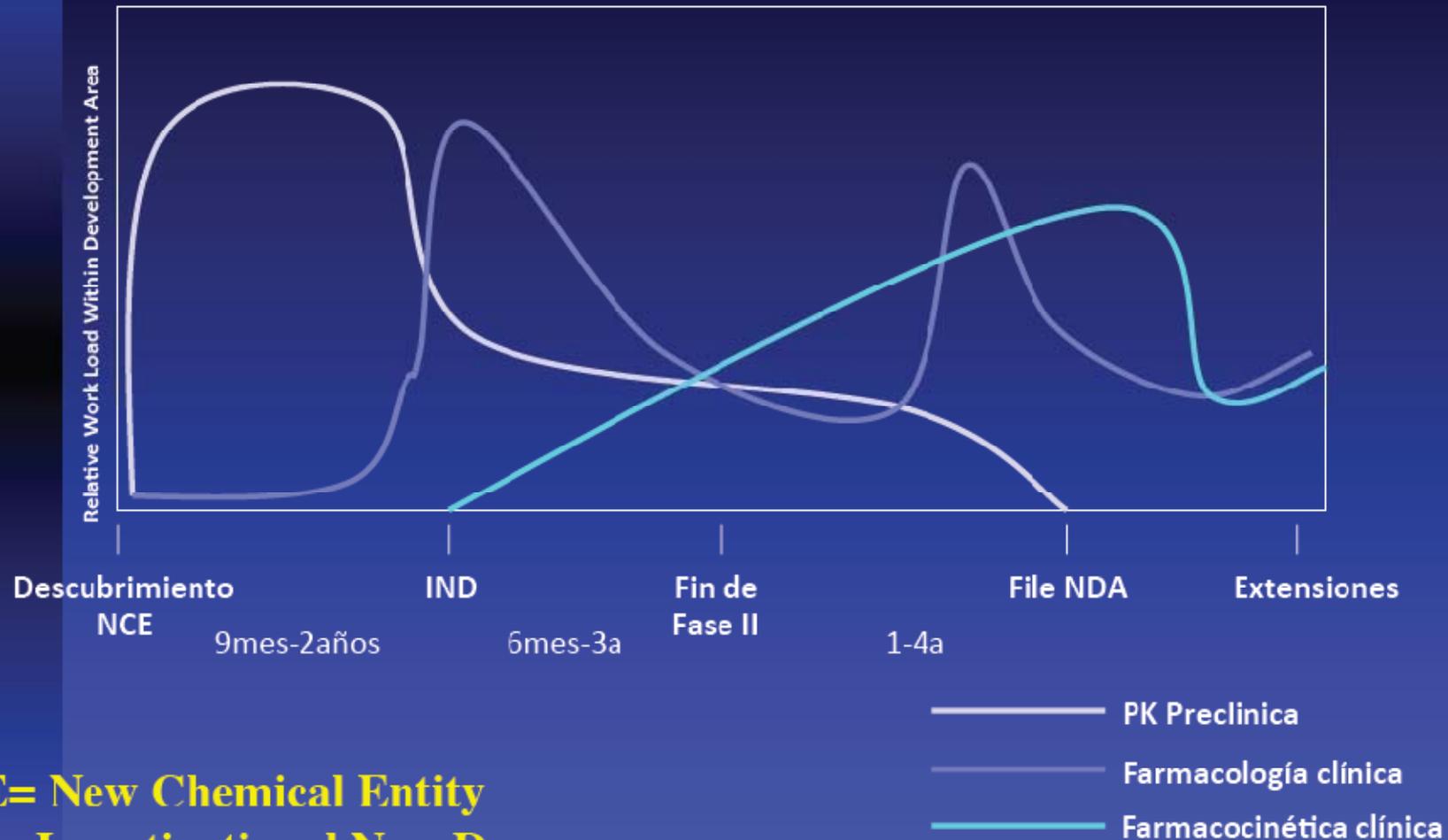


Desarrollo de nuevos fármacos

Objetivo de investigación

Síntesis del compuesto	3 años
Screening	3 años
Fase preclínica	2 años
Fase clínica I	2 años
Fase clínica II	6 meses
Fase clínica III	1 año
Registro en organismos oficiales	6 meses a 1 año
Introducción y venta	1 año

PK/PD en desarrollo de fármacos

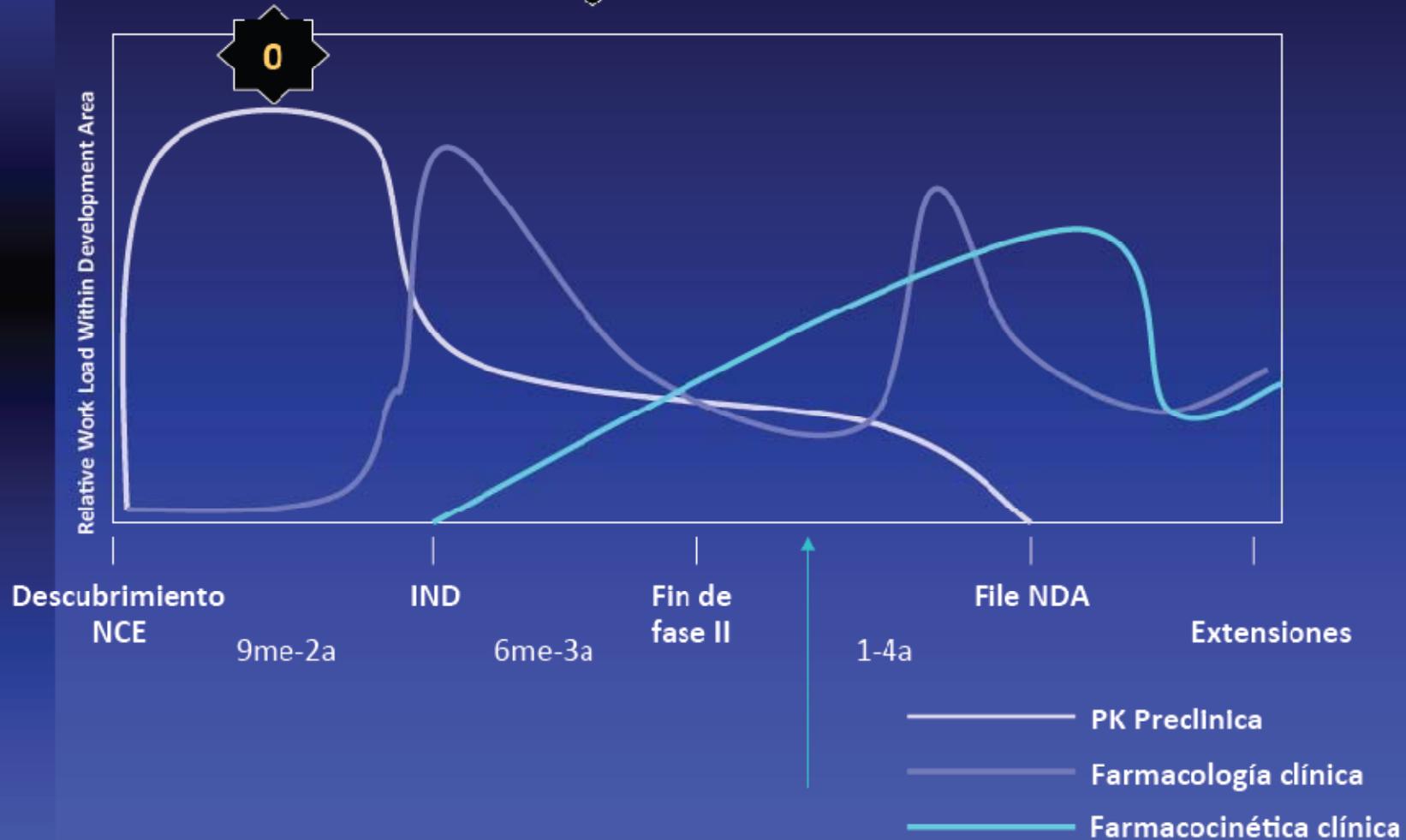


NCE= New Chemical Entity
IND= Investigational New Drug
NDA= New Drug Application

PK/PD en desarrollo de fármacos



Fase preclínica – ¿se puede dar a humanos?



Fase clínica

Estudios Fase I

Voluntarios sanos (pacientes)

Farmacocinética

Seguridad. Efectos asociados
a dosis altas

Efectividad (si es posible).

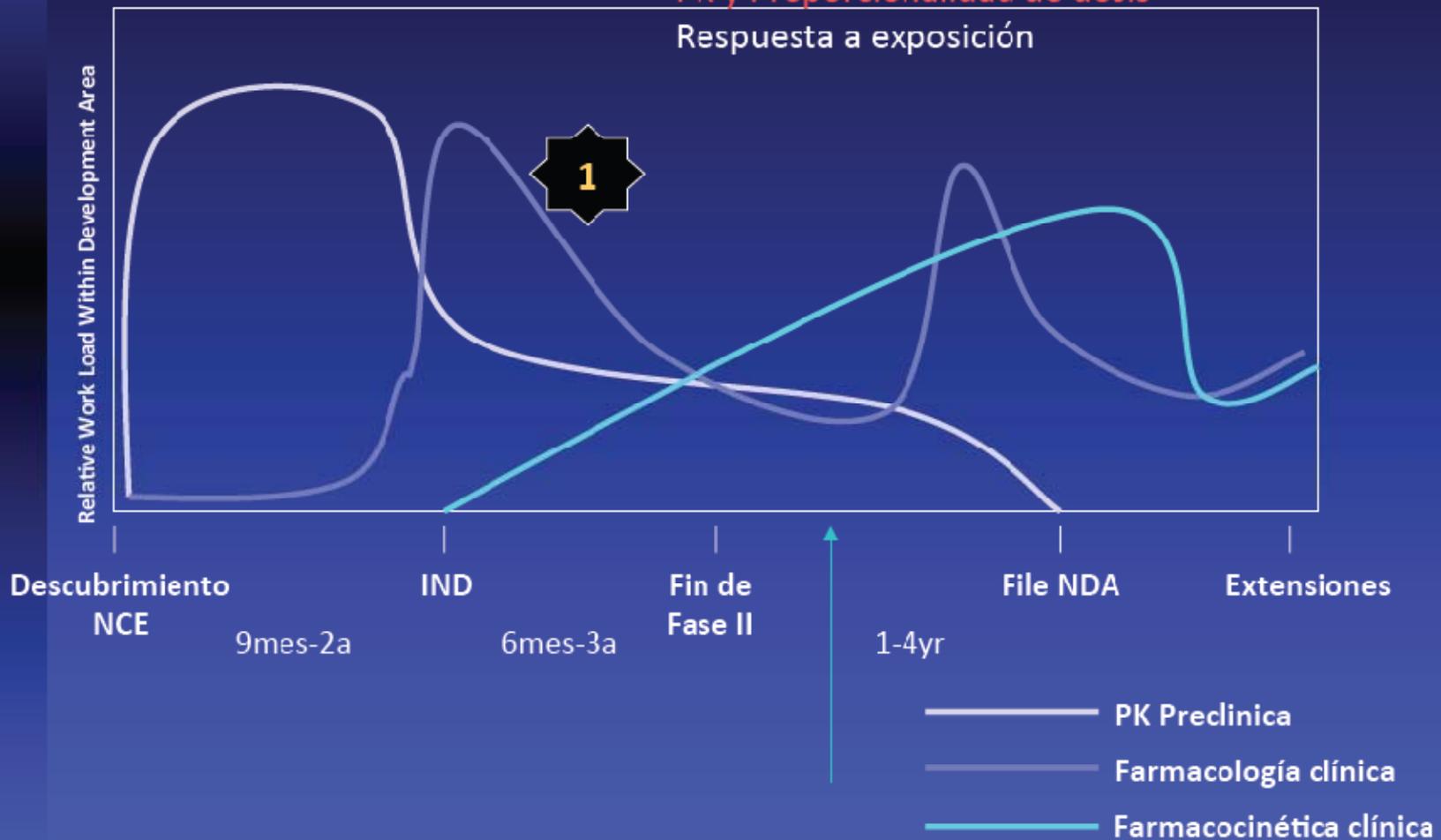
Diseñar fase II

20-80 sujetos

PK/PD en desarrollo de fármacos

1

Evaluación/Mecanismo
Seguridad y Tolerancia
PK y Proporcionalidad de dosis
Respuesta a exposición



F_{ASE} II

Estudios en pacientes

Protocolos bien establecidos

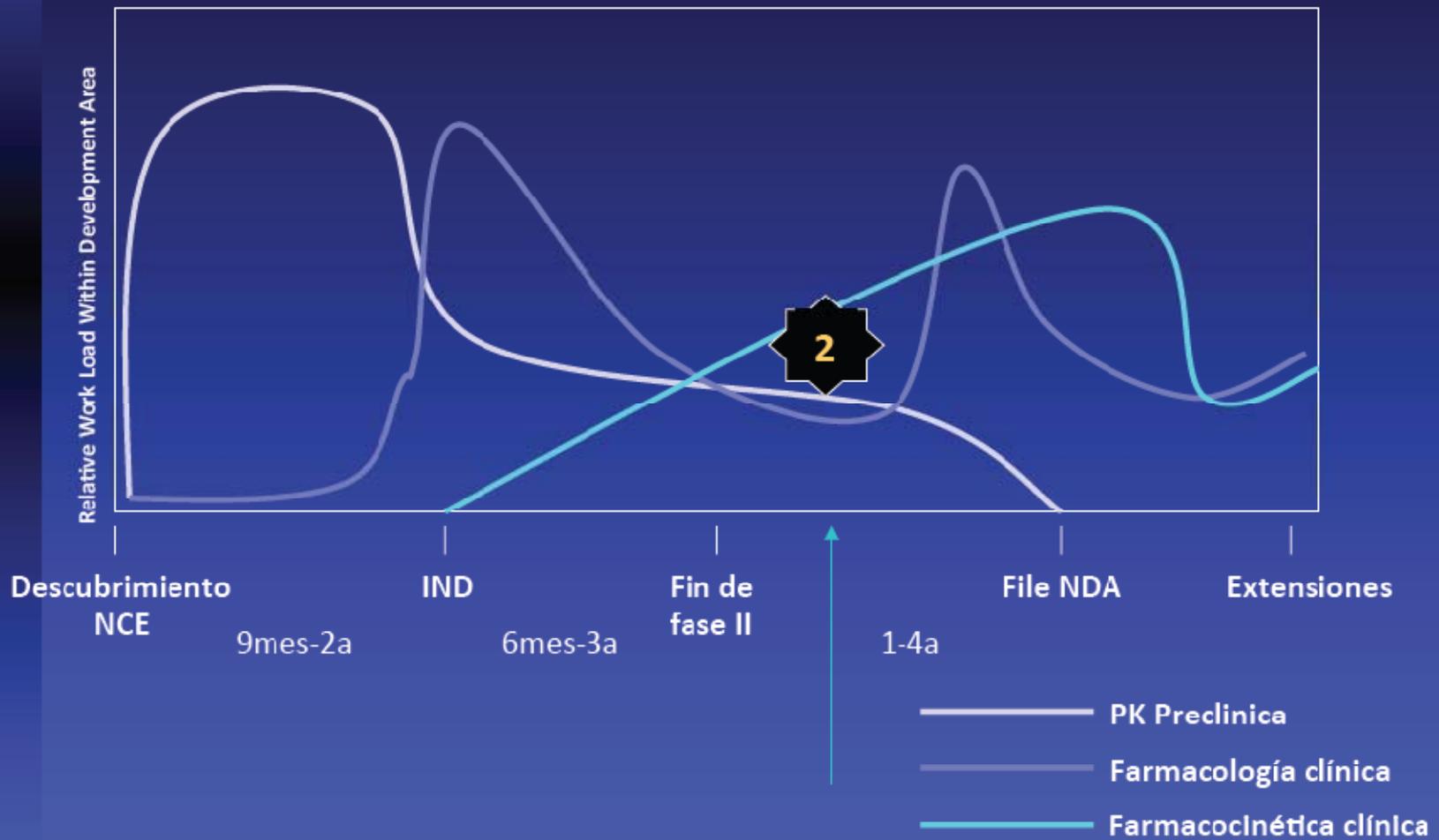
Eficacia y seguridad del
principio activo en la
enfermedad

Propuesta régimen
dosificación

PK/PD en desarrollo de fármacos

2

Selección de dosis para Fase III



F_{ASE} III



Estudios controlados y no controlados

Información adicional acerca de la eficacia y seguridad

Relaciones riesgo/beneficio

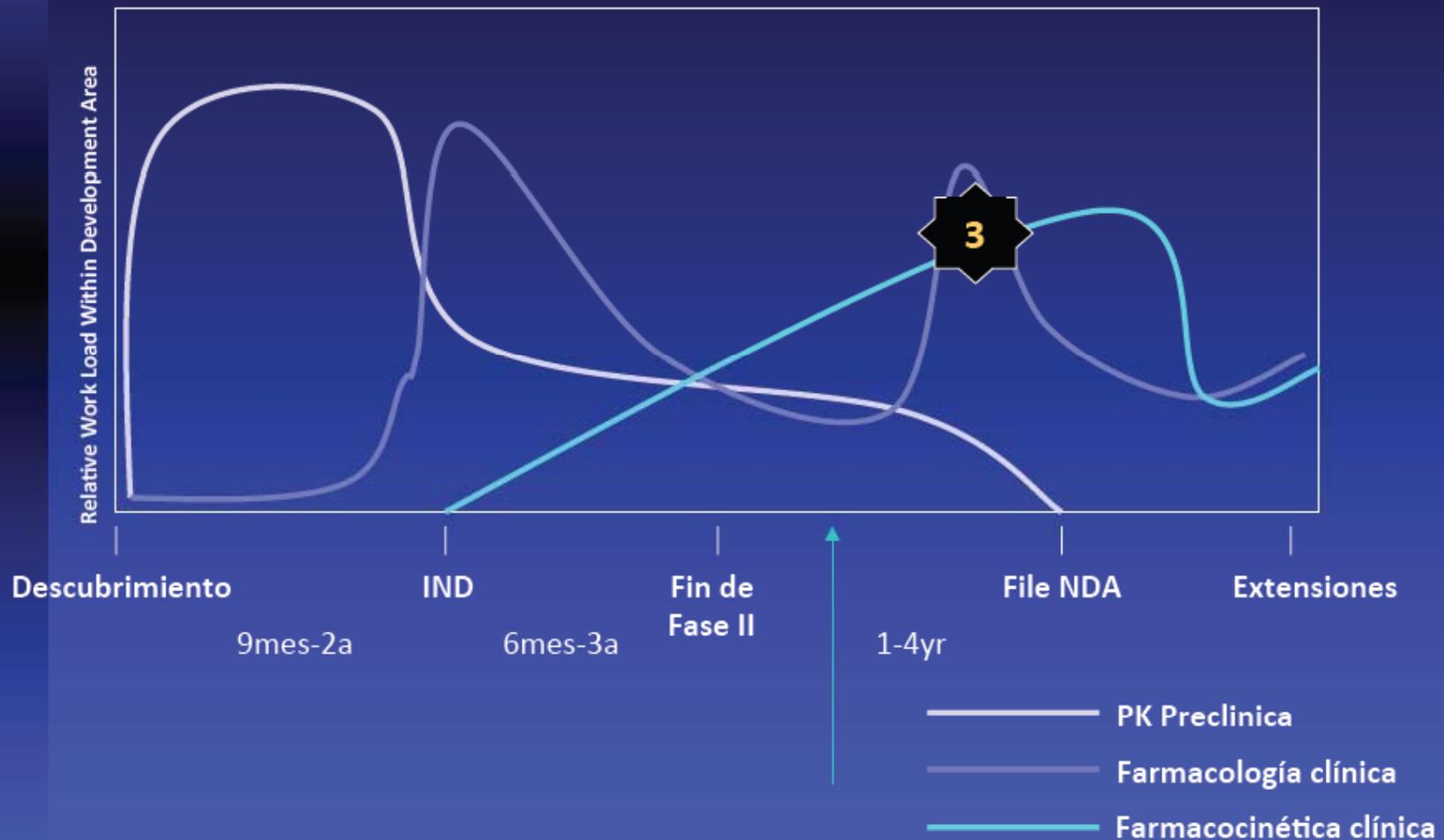
Varios cientos a miles

Poblaciones especiales

PK/PD en desarrollo de fármacos

3

Poblaciones especiales
geriátricos, Pediátricos, Hepático, Renal
Formulaciones bajo estudio (BE)
Interacciones fármaco-fármaco



F_{ASE} IV

El medicamento ya esta a la venta.

Estudios multicéntricos que documenten la eficacia y seguridad

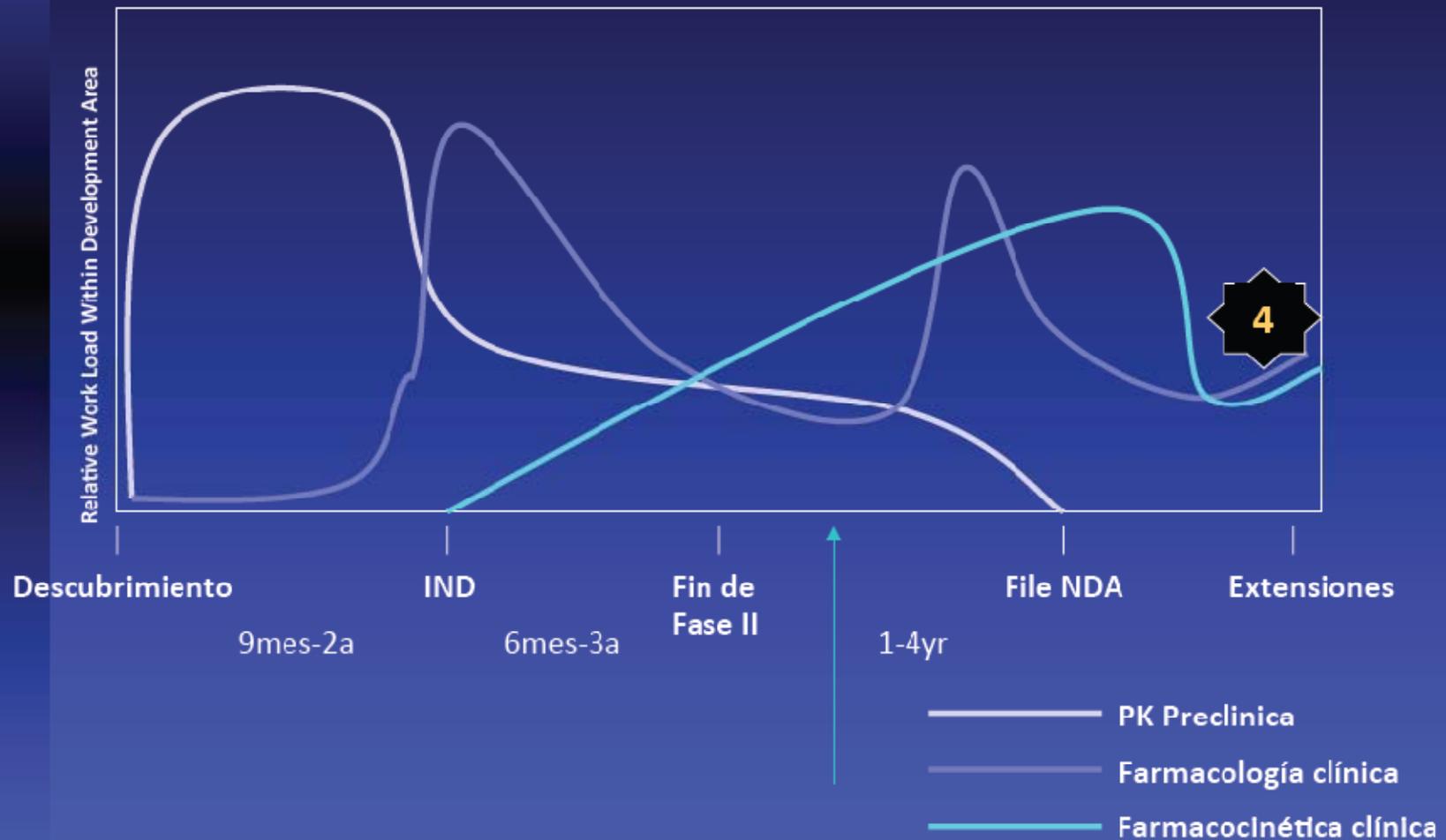
Cientos a miles



PK/PD en desarrollo de fármacos

4

Estudios mercadotecnia
Poblaciones abiertas.
Extensiones



Etapas del desarrollo de nuevos fármacos.



- o Determinación de la actividad biológica
- o Farmacodinamia
- o Toxicidad
- o Mecanismo de acción (?)
- o **Estudios Biofarmacéuticos**

Pruebas en
Humanos/ Pacientes
Poblaciones especiales

Comercialización del producto

NCE: New Chemical Entity → **IND: Investigational New Drugs** → **NDA (New Drug Application)**

ICH: M3 *Nonclinical Safety Studies for the Conduct of human Clinical Trials for Pharmaceuticals*, Guidance for Industry 1997

OECD 417: *Toxicokinetics*, Guideline for testing of chemicals, 1984

EMA: *Note for guidance on the Pre-clinical evaluation of anticancer medicinal products*, 1998

ESTUDIOS PRECLÍNICOS

OBJETIVOS GENERAL

Evaluar la seguridad y eficacia del fármaco candidato en modelos in vitro y biológicos (animales) , con la finalidad de proponer, si procede, una dosis inicial en humanos

OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluación de las “deseables “ propiedades del fármaco candidato
- Frecuencia de dosificación ($t_{1/2}$)
- Biodisponibilidad (F)
- Interacciones biológicas (ej. Glicoproteína P)
- Metabolismo (CYPS)
- Efectos adversos
- Estudios alométricos (hacia la clínica)

Farmacocinética preclínica

Es aquella que se lleva a cabo en animales de laboratorio con el objetivo de:

- Evaluar la absorción del fármaco y su cinética de eliminación
- Determinar si es inhibidor o inductor enzimático
- Etapa precursora lógica para el diseño adecuado de estudios toxicológicos en animales
- Correlaciona interespecies para predecir mediante la adecuada extrapolación las características farmacocinéticas en el hombre.

ESTUDIOS EN LA FASE PRECLÍNICA

- FARMACOLOGÍA
- TOXICOLOGÍA
- ABSORCIÓN
- DISTRIBUCIÓN
- METABOLISMO
- ELIMINACIÓN
- FARMACOCINÉTICA
- QUÍMICA ANALÍTICA (DESARROLLO DE MÉTODOS BIOANALÍTICOS)

ESTUDIOS PRECLÍNICOS NECESARIOS

Un típico estudio preclínico abarca los siguientes ensayos

- Propiedades Fisicoquímicas del fármaco
- Dosis crónica/aguda. Determinación de DL50, Genotoxicidad
- Desarrollo y Validación de Métodos Bioanalíticos
- Farmacocinética de dosis simple, proporcionalidad de dosis (farmacocinética lineal o no) y biodisponibilidad en modelos animales roedores y no roedores
- Farmacocinética de dosis múltiple en una especie roedor y no roedores
- Unión a proteínas (en plasma humano y/o animales)
- Estudios de metabolismo in vitro (inhibición/activación de CYP's) en hepatocitos y/o microsomas
- Balance de masa y rutas de excreción del fármaco

Otros ensayos que generalmente se realizan son los siguientes

- Distribución tisular
- Toxicogenómica
- Identificación de metabolitos (estructura)



PREDICCIÓN DE LAS PROPIEDADES FARMACOCINÉTICAS
HACIA LA CLÍNICA

PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DEL FÁRMACO:

- pKa
- Coeficiente de partición
- Solubilidad
- Estabilidad
- Permeabilidad
- Proceso de síntesis
- Método analítico



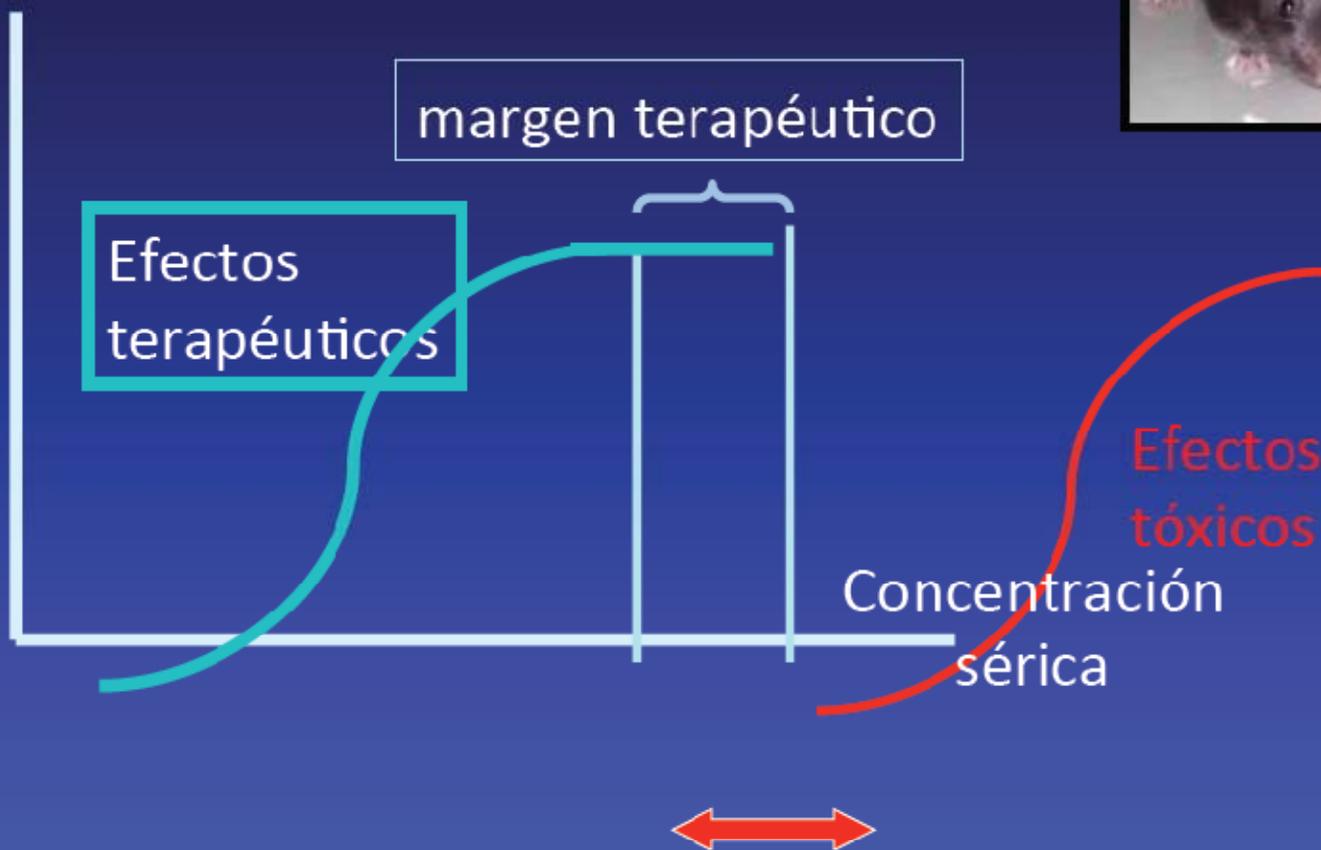
ESTUDIOS PRECLÍNICOS NECESARIOS

Un típico estudio preclínico abarca los siguientes ensayos:

- **Propiedades Fisicoquímicas del fármaco v**
- Dosis crónica/aguda. Determinación de DL50
- Desarrollo y Validación de Métodos Bioanalíticos
- Farmacocinética de dosis simple, proporcionalidad de dosis (farmacocinética lineal o no) y biodisponibilidad en modelos animales roedores y no roedores
- Farmacocinética de dosis múltiple en una especie roedor y no roedores
- Unión a proteínas (en plasma humano y/o animales)
- Estudios de metabolismo in vitro (inhibición/activación de CYP's) en hepatocitos y/o microsomas
- Balance de masa y rutas de excreción del fármaco

• Dosis crónica/aguda. Determinación de DL50

%
respuest
a



Ratas mantenidas en un estudio de toxicidad típico de 26 semanas para evaluación farmacocinética.



Semana	Sexo y grupo	No. de ratas	Estudio farmacocinético
10	Macho, alta	12	Dosis oral alta múltiple
12	Macho, baja	12	Dosis oral baja múltiple
14	Hembra, baja	12	Dosis oral baja múltiple
16	Macho, control	12	Dosis oral simple alta
17	Macho, control	12	Dosis oral simple baja
18	Hembra, control	12	Dosis oral simple baja
19	Macho, control	12	Dosis intravenosa simple

60 RATAS

La secuencia puede variar.

Conducir los estudios de dosis alta múltiple tan pronto sea posible para minimizar la posibilidad de pérdida de animales debido a muertes relacionadas con el fármaco.

ESTUDIOS PRECLÍNICOS NECESARIOS

Un típico estudio preclínico abarca los siguientes ensayos:

- **Propiedades Fisicoquímicas del fármaco v**
- **Dosis crónica/aguda. Determinación de DL50 v**
- Desarrollo y Validación de Métodos Bioanalíticos
- Farmacocinética de dosis simple, proporcionalidad de dosis (farmacocinética lineal o no) y biodisponibilidad en modelos animales roedores y no roedores
- Farmacocinética de dosis múltiple en una especie roedor y no roedores
- Unión a proteínas (en plasma humano y/o animales)
- Estudios de metabolismo in vitro (inhibición/activación de CYP's) en hepatocitos y/o microsomas
- Balance de masa y rutas de excreción del fármaco

Desarrollo y Validación de Métodos Bioanalíticos

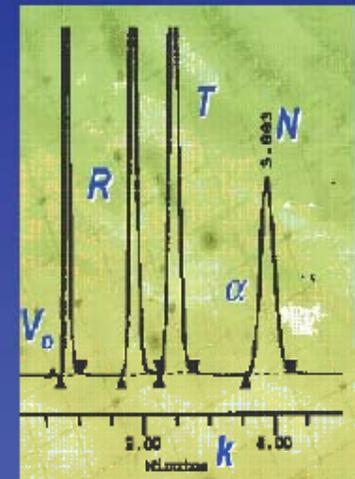
• Desarrollo de métodos Bioanalíticos

- Tipo de fluido biológico (sangre, plasma, tejidos, LCR)
- Extracción (Precipitación de Proteínas, Extracción en fase sólida)
- Equipo de Cuantificación:

ESPECTROFOTOMETRÍA
CROMATOGRFÍA DE LÍQUIDOS
CROMATOGRFÍA DE GASES
INMUNOENSAYOS

•Validación de Métodos Bioanalíticos

- Objetivo: Contar con evidencia experimental documentada que el método bioanalítico sirve para lo que fue creado, en base a parámetros establecidos
- Linealidad
- Precisión (Repetibilidad y Reproducibilidad)
- Exactitud
- Recobro
- Estabilidad
- Robustez
- Selectividad/Especificidad
- Supresión iónica (Métodos Masas)



Validación de Métodos Bioanalíticos

GUIDANCE FOR INDUSTRY¹

Bioanalytical Method Validation

This guidance represents the Food and Drug Administration's current thinking on this topic. It does not create or confer any rights for or on any person and does not constitute the binding FDA or the public. An alternative approach may be used if such approach satisfies the requirements of the applicable statute and regulation.

I. INTRODUCTION

This guidance provides assistance to sponsors of investigational new drug applications (INDs), new drug applications (NDAs), abbreviated new drug applications (ANDAs), and supplements in developing bioanalytical method validation information used in human clinical pharmacology, bioavailability (BA), and bioequivalence (BE) studies requiring pharmacokinetic (PK) evaluation. This guidance also applies to bioanalytical methods used for non-human pharmacology/toxicology studies and practical studies. For studies related to the veterinary drug approval process, this guidance applies only to blood and urine BA, BE, and PK studies.

The information in this guidance generally applies to bioanalytical procedures such as gas chromatography (GC), high-pressure liquid chromatography (LC), combined GC and LC mass spectrometric (MS) procedures such as LC-MS, LC-MS-MS, GC-MS, and GC-MS-MS performed for the quantitative determination of drugs and/or metabolites in biological matrices such as blood, serum, plasma, or urine. This guidance also applies to other bioanalytical methods, such as immunological and microbiological procedures, and to other biological matrices, such as tissue and skin samples.

This guidance provides general recommendations for bioanalytical method validation. The recommendations can be adjusted or modified depending on the specific type of analytical method used.

II. BACKGROUND

¹ This guidance has been prepared by the Bioanalyticals Consulting Committee in the Center for Drug Evaluation and Research (CDER) in cooperation with the Center for Veterinary Medicine (CVM) at the Food and Drug Administration.

Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation

[FDA] Food and Drug Administration:
ICH Harmonized Tripartite Guideline:
Validation of Analytical Procedures:
Definitions and Terminology, ICH
Topic Q2A. Federal Register 60(40)
11200-11262-1005

[FDA] Food and Drug Administration:
ICH Harmonized Tripartite Guideline:
Validation of Analytical Procedures:
Methodology, ICH Topic Q2B. Federal
Register 2(96) 27464-27467, 1997

VIÉNTES 7 DE NOVIEMBRE DE 1998 DIARIO OFICIAL (PRIMERA SECCIÓN) 1

SECRETARÍA DE SALUD

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-177-SSA1-1998, QUE ESTABLECE LAS PRUEBAS Y PROCEDIMIENTOS PARA DEMOSTRAR QUE UN MEDICAMENTO ES INTERCAMBIABLE. REQUISITOS A QUE DEBEN SUJETARSE LOS TERCEROS AUTORIZADOS QUE REALIZAN LAS PRUEBAS.

A FIANZA DE 1998 CON EL SEGURO NACIONAL QUE DICE: ESTADOS UNIDOS MEXICANOS.- DECRETO DE 1998. NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-177-SSA1-1998, QUE ESTABLECE LAS PRUEBAS Y PROCEDIMIENTOS PARA DEMOSTRAR QUE UN MEDICAMENTO ES INTERCAMBIABLE. REQUISITOS A QUE DEBEN SUJETARSE LOS TERCEROS AUTORIZADOS QUE REALIZAN LAS PRUEBAS. LLEVA DENOMINACIÓN OFICIAL PLURILINGÜE. CRÉDITOS GENERALES. RESUMEN PARA EL DÍA DE LA LEY. CON TITULO EN LOS ARTÍCULOS 25 DE LA Ley Orgánica de la Administración Pública Federal, 13 apartado A, fracción I, 56, fracciones V y VI, 101, 104, 121, 257, 258, 259, 260, fracción I, y 261 de la Ley Orgánica de Salud; 36, fracción II, 41, fracciones II, III y VIII, 45, 46, 49, 50, fracciones I y II, y 49 de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización; 12, 20, 102 y 211 del Reglamento de Insuficiencias para la Salud; 50, apartado A, fracción V, 57 y 58 del Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud; 10, fracción VI, 20, fracciones II, IV y XVI y 23, fracción IX, del Reglamento Interior de la Secretaría de Salud; me permite ordenar la publicación en el Diario Oficial de la Federación de la Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998, que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados que realizan las pruebas.

CONSIDERANDO

Que con fecha 10 de noviembre de 1993, en cumplimiento de lo previsto en el artículo 40 fracción I de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización, la Dirección General de Insuficiencias para la Salud presentó al Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario, el anteproyecto de la presente Norma Oficial Mexicana.

Que con fecha 20 de enero de 1998, en cumplimiento del acuerdo del Comité y de lo previsto en el artículo 47 fracción I de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización, se publicó en el Diario Oficial de la Federación el proyecto de la presente Norma Oficial Mexicana, a efecto de que dentro de los siguientes sesenta días hábiles posteriores a dicha publicación, los interesados presentaran sus comentarios al Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario.

Que las sugerencias o los comentarios recibidos por el mencionado comité, fueron publicados previamente a la expedición de esta Norma en el Diario Oficial de la Federación, en los términos del artículo 47 fracción II de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización.

Que en atención a las anteriores consideraciones, estando en la opinión del Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario, se expide la siguiente Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998, que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados que realizan las pruebas.

ÍNDICE

1. Objeto
2. Campo de aplicación
3. Referencias
4. Definiciones
5. Símbolos y abreviaturas
6. Criterios y requisitos generales para las pruebas
7. Criterios y requisitos para la evaluación de perfiles de liberación en formas farmacéuticas orales de liberación inmediata
8. Criterios y requisitos para realizar pruebas de bioequivalencia en humanos
9. Criterios y requisitos para el análisis químico de muestras biológicas de una prueba de bioequivalencia
10. Criterios y requisitos para los terceros autorizados que realizan las pruebas
11. Bibliografía
12. Concordancia con normas internacionales y mexicanas
13. Observancia de la Norma
14. Vigencia
15. Aducciones
1. Objetivo

NOM-177

Secretaría de Salud (SSA),
Norma Oficial Mexicana
NOM-177-SSA-1-1998

ESTUDIOS PRECLÍNICOS NECESARIOS

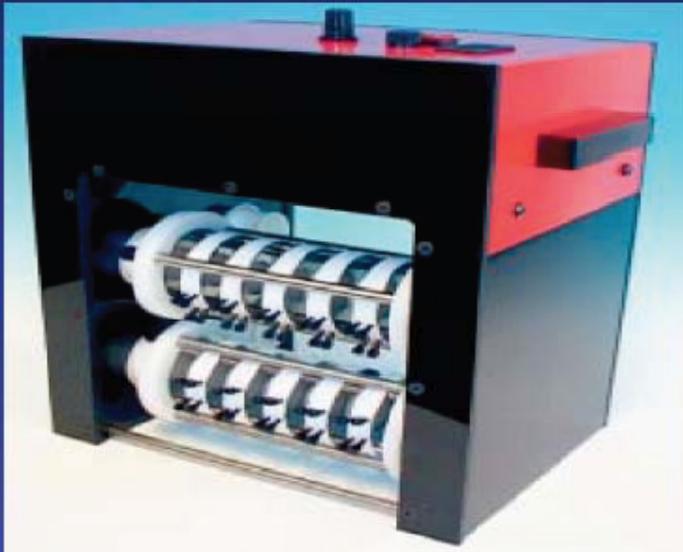
Un típico estudio preclínico abarca los siguientes ensayos:

- **Propiedades Fisicoquímicas del fármaco v**
- **Dosis crónica/aguda. Determinación de DL50 v**
- **Desarrollo y Validación de Métodos Bioanalíticos v**
- Farmacocinética de dosis simple, proporcionalidad de dosis (farmacocinética lineal o no) y biodisponibilidad en modelos animales roedores y no roedores
- Farmacocinética de dosis múltiple en una especie roedor y no roedores
- Unión a proteínas (en plasma humano y/o animales)
- Estudios de metabolismo in vitro (inhibición/activación de CYP's) en hepatocitos y/o microsomas
- Balance de masa y rutas de excreción del fármaco

Un típico estudio preclínico abarca los siguientes ensayos:

- **Propiedades Fisicoquímicas del fármaco ✓**
- **Dosis crónica/aguda. Determinación de DL50 ✓**
- **Desarrollo y Validación de Métodos Bioanalíticos ✓**
- **Farmacocinética de dosis simple, proporcionalidad de dosis (farmacocinética lineal o no) y biodisponibilidad en modelos animales roedores y no roedores✓**
- **Farmacocinética de dosis múltiple en una especie roedor y no roedores ✓**
- Unión a proteínas (en plasma humano y/o animales)
- Estudios de metabolismo in vitro (inhibición/activación de CYP's) en hepatocitos y/o microsomas
- Balance de masa y rutas de excreción del fármaco

Unión a proteínas (en plasma humano y/o animales)



Multi-Equilibrium

Dialyzer™



Importancia del Metabolismo en el desarrollo de Nuevos Medicamentos.

- **Ayuda a identificar el potencial de interacción del fármaco en el ser humano.**
- Puede explicar diferencias interindividuales y étnicas
- Puede indicar la necesidad de modificación estructural

En sistemas in vitro

- Selección del modelo animal
- **Generación e identificación de Metabolitos**
- Desarrollo de métodos Analíticos
- Identificación sistemas enzimáticos

Estudios de metabolismo in vitro (inhibición/activación de CYP's) en hepatocitos y/o microsomas

Metabolismo

→ Fase 1 (Por el citocromo P450)-
Diferentes familias CYP3A4, CYP2D6,
CYP3A1

→ Fase 2 (Reacciones de
conjugación) Glucorónido,
glicina, etc.



Estudios de metabolismo in vitro (inhibición/activación de CYP's) en hepatocitos y/o microsomas

Estudios Metabólicos:

- Citotoxicidad del fármaco sobre los hepatocitos
- Estabilidad metabólica: Determinar el porcentaje remanente de fármaco y el $t_{1/2}$ cuando el fármaco se incuba con hepatocitos criopreservados o frescos.



- Estudios de inhibición metabólica
- Determinación de metabolitos in vitro (humanos y animales)

Un típico estudio preclínico abarca los siguientes ensayos:

- **Propiedades Fisicoquímicas del fármaco ✓**
- **Dosis crónica/aguda. Determinación de DL50 ✓**
- **Desarrollo y Validación de Métodos Bioanalíticos ✓**
- **Farmacocinética de dosis simple, proporcionalidad de dosis (farmacocinética lineal o no) y biodisponibilidad en modelos animales roedores y no roedores ✓**
- **Farmacocinética de dosis múltiple en una especie roedor y no roedores ✓**
- **Unión a proteínas (en plasma humano y/o animales) ✓**
- **Estudios de metabolismo in vitro (inhibición/activación de CYP's) en hepatocitos y/o microsomas ✓**
- **Balance de masa y rutas de excreción del fármaco**

Estudios ADME. Dosificación

Vía oral. En la mayoría de los estudios toxicológicos en la rata, el fármaco de prueba se administra ya sea por cánula o por incorporación en la dieta.

Se deben considerar

interacciones fármaco-dieta o uniones, Para datos farmacocinéticos es importante la vía y modo de administración usados también en toxicidad.

Estudios ADME. Colección de datos

Se monitorean concentraciones de fármaco y materiales relacionados en sangre así como tejidos y órganos.

Confinando a los animales en jaulas apropiadas, se puede hacer un balance de masa como pérdida potencial de excreta.

El homogenado de tejidos se extrae para aislarlo y determinar cuantitativamente el fármaco inalterado y sus metabolitos.

Estudios ADME. Colección de datos

La colección cuantitativa y análisis de orina y heces a intervalos designados de postdosis provee útil información en **la velocidad y extensión de excreción del fármaco y sus metabolitos via renal y mecanismos biliares (circulación enterohepática)**

En Farmacocinética

$$k_e = k_m + k_{ex} + k_p + \dots k_n$$

En donde :

k_e = constante de eliminación global

k_m = constante metabólica

k_{ex} = constante de excreción renal

k_p = constante de eliminación pulmonar

k_n = constante de eliminación por otras vías.

Estudios ADME en perros

Se utilizan **perros control**

No asociado a estudios de toxicidad

se colectan **sangre y excreta** después de recibir **dosis simples de fármaco marcado tanto orales como intravenosas.**

El perfil farmacocinético se define para cada perro y se utiliza para interpretar manifestaciones tóxicas observadas en el mismo animal.

Estudios en un programa ADME en perros normales

Colectar sangre, orina y heces bajo una dosis simple radioactiva en perros controles no asociados con los estudios de toxicidad

Oral, baja	Macho	3
Oral alta	Macho	3
Intravenosa	Macho	3

Estudios ADME en perros

Los datos generados ayudan a estimar:

- Biodisponibilidad absoluta (del fármaco inalterado) y absorción total
- Patrón de eliminación de la dosis administrada
- Escalas Alométricas

Estudios ADME en perros

Colección de muestras

Muestras de sangre seriada pueden obtenerse de un perro, directo de la vena femoral o cefálica.

Las heces y orina completa se pueden coleccionar a intervalos designados por un periodo suficientemente grande para recuperar la administración radioactiva, generalmente de 4 a 5 días.

Estudios ADME en perros

Colección de muestras

La bilis se puede coleccionar cuando es necesario por los ductos biliares. Marshall y col. describieron un procedimiento de canulación del ducto biliar crónico que permite coleccionar bilis durante el experimento

Estudios de farmacocinética preclínica en Biofarmacia

- Desarrollo y validación de metodología analítica en fluido biológico (plasma, suero y sangre) por CLAR y espectrofotometría uv-visible
- Determinación de solubilidad en diferentes disolventes (suero salino, suero glucosado, sol fosfatos pH 7.4, disolventes orgánicos, etc)
- Determinación de estabilidad a diferentes temperaturas y en presencia y ausencia de luz, y a diferentes pH.
- Determinación del pKa por el método espectrofotométrico

Estudios de farmacocinética preclínica en Biofarmacia

- Estudios de unión a proteínas plasmáticas por 2 métodos (diálisis al equilibrio y ultrafiltración)
- Estudios de cinética in vitro (relación sangre-plasma)
- Estudios de absorción del fármaco in vitro con células Caco-2
- Estudios de farmacocinética preclínica en rata, conejo y perro.

ESTUDIOS PRECLINICOS

■ PROPIEDADES FISICOQUIMICAS DEL FARMACO:

pKa

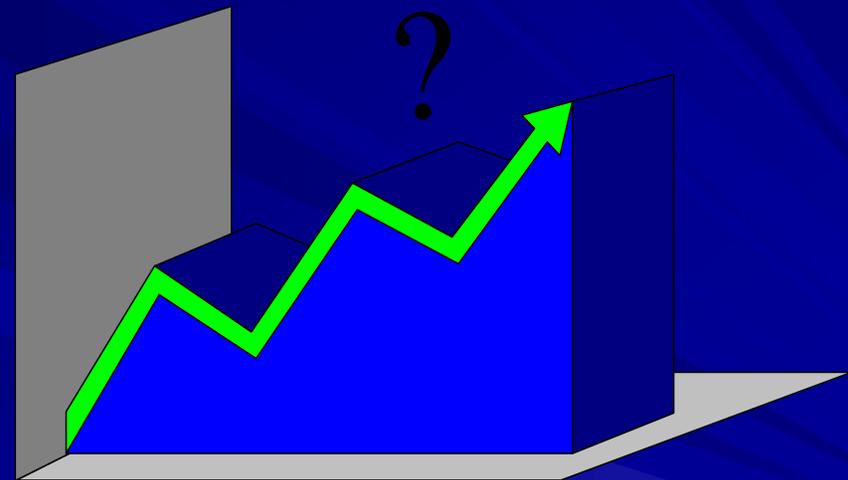
Coeficiente de partición

Solubilidad

Estabilidad

Proceso de síntesis

Método analítico validado



Grave problemas cuando se usa la sustancia para realizar todos los estudios preclínicos, pruebas y aseguramiento de calidad. El estudio debe estar documentado de acuerdo a las Buenas Prácticas de Laboratorio con una perspectiva de calidad.

Determinación pKa

■ Métodos

- espectrofotométricos
- Cromatográficos
- volumétricos

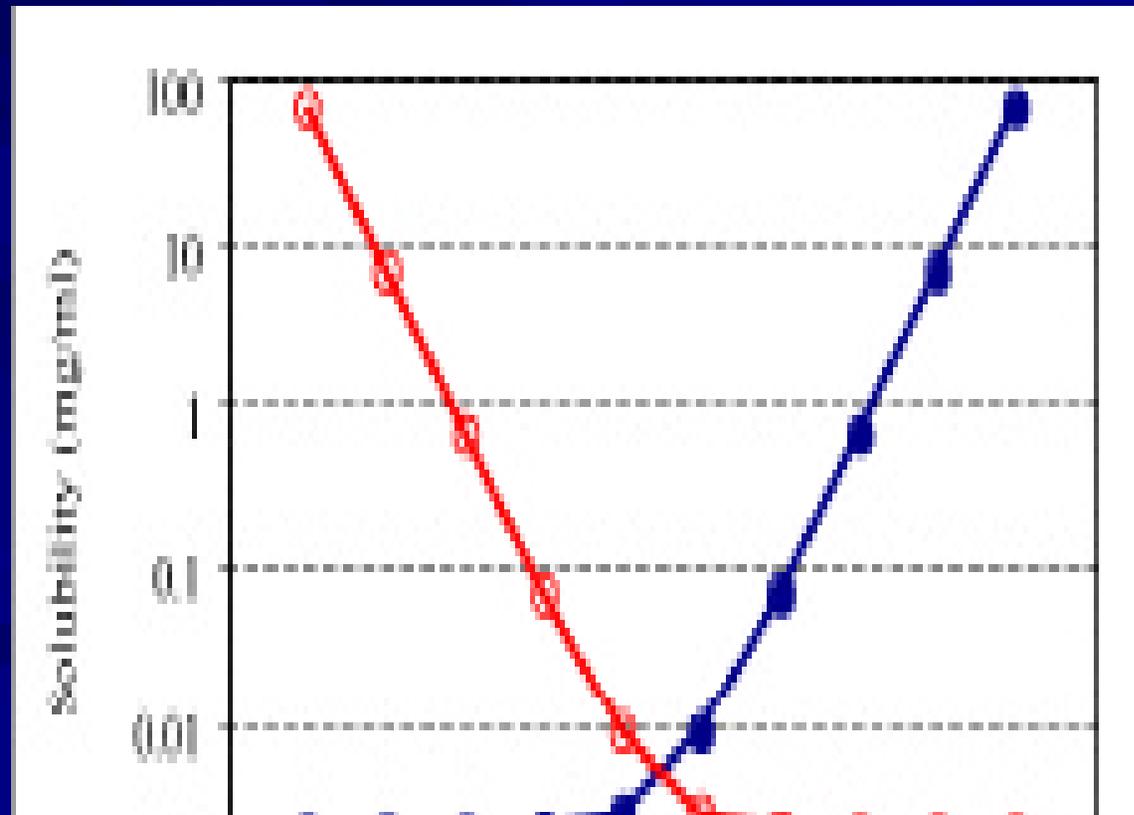
Determinación del coeficiente de partición

- Considerando octanol/solución amortiguadora pH6.8
- Determinación de $\log D$

Método
analítico
validado

Determinación de solubilidad

- Gráfico solubilidad vs pH (método analítico validado)



Determinación de estabilidad

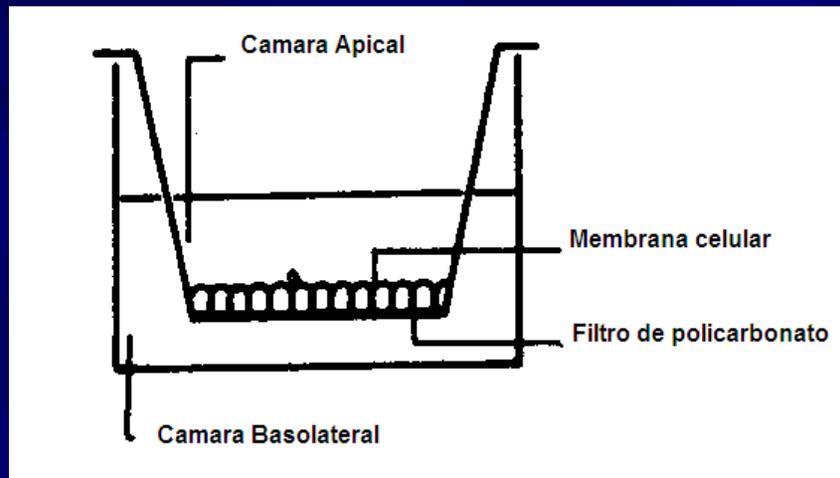
- Estabilidad en diferentes soluciones amortiguadoras: pH 1.2, 4.5, 6.8, 7.4, 8.0
 - En solución salina
 - En solución glucosada
- Método analítico validado para la cuantificación del compuesto

Unión a proteínas plasmáticas

- Método de diálisis al equilibrio
- Método in vitro.
- Proteína está contenida en un compartimento separada por una membrana permeable a todos los otros componentes del sistema excepto al de la proteína misma
- En equilibrio: la actividad del ligando libre es la misma en ambos lados de la membrana.
- Si se conoce la cantidad total del fármaco en el sistema, la cantidad de fármaco unido a la proteína puede ser calculada fácilmente:



Estudios de permeabilidad



Representación esquemática del sistema de cultivo para determinar la permeabilidad aparente

- Caco-2, HT-29, TC-7, T-84, ECV304, MDCK

- Coeficiente de permeabilidad aparente

$$P_{app} = \frac{dQ}{dt} \frac{1}{C_0 A}$$

Transporte a través de membranas

FASE PRECLINICA



ESTUDIOS EN ANIMALES
FARMACOLOGICOS
TOXICOLOGICOS
FARMACOCINETICOS



Evaluación de los efectos clínicos

- El fabricante (laboratorio) debe llenar una solicitud para investigar un nuevo fármaco a las oficinas reguladoras.
- Solicitar autorización para distribuir el fármaco a investigadores calificados para que realicen estudios clínicos que permitan obtener suficiente evidencia respecto a: dosis eficacia y seguridad del nuevo fármaco en seres humanos.

PROCESO REGULATORIO

- Difiere de país a país
- Demanda producto seguro y calidad
- Estudios clinicos siempre y cuando los datos de animales y voluntarios sean adecuados
- Aprueba protocolos y examina datos
- 50-400 VOLUMENES (30,000-150,000 páginas)
- Datos originales disponibles
- Autoridad y empresa tratando de producir producto seguro y efectivo
- Aprobado uso terapéutico específico

Medicamentos nuevos

- Desarrollo farmacéutico: Forma farmacéutica, formulación, proceso de manufactura, controles de proceso, sistema contenedor cierre
- Instalaciones
- Información de fabricación y proceso
- Control de producto terminado:
- Especificaciones
- Métodos analíticos
- Validación de métodos analíticos
- Estabilidad

Registro de Medicamentos nuevos

- Indicaciones terapéuticas
- Condiciones de uso
- Información para prescribir
- Estudios preclínicos: farmacodinamia, interacciones farmacológicas, farmacocinética: dosis única, dosis múltiple, métodos analíticos
- Toxicología y seguridad
- Dosis única
- Dosis múltiples
- Genotoxicidad y mutagenicidad
- Carcinogenicidad
- Toxicidad sobre reproducción y desarrollo
- Tolerancia local, si procede

Registro de medicamentos nuevos

- Información de fabricación del fármaco
- Validación del proceso de fabricación
- Control del fármaco: especificaciones del fármaco, espectrogramas o cromatogramas, métodos analíticos empleados. (FEUM, otras farmacopeas)*
- Certificados de análisis del fármaco y del medicamento
- Estabilidad del fármaco
- Material de envase primario
- Aditivos con certificado de análisis

SCB

BCS, Sistema de Clasificación Biofarmacéutica

“Las diferencias de la disolución in vivo en el tracto gastrointestinal son la razón principal para observar diferencias en la biodisponibilidad de dos productos de liberación inmediata (LI) conteniendo el mismo fármaco”

SCB

- Un fármaco, cuando se administra por vía oral, de acuerdo a SCB, se puede clasificar en:
 - Alta o baja solubilidad
 - Alta o baja permeabilidad

Altamente soluble

- La dosis mas alta se solubiliza en 250 mL o menos en agua en un pH de 1-8.
 - (250mL: Fármaco administrado con 8 onzas de fluído)

Altamente permeable

- La extensión de la absorción en humanos se establece como no mas del 90% de una dosis administrada en una comparación a una dosis iv. $F \geq 0.9$

Determinación solubilidad

- Objetivo: Determinar la solubilidad al equilibrio de un fármaco bajo condiciones fisiológicas aproximadas:
 - Determinar perfiles de pH-solubilidad en un intervalo de pH 1-8.
 - Preferiblemente 8 o más condiciones de pH
 - no se deben usar Sols. Amortiguadores que reaccionen con el fármaco

El tipo de solubilidad determinada calculando el volumen de un medio acuoso es suficiente para disolver la dosis más alta

*Altamente soluble: cuando la dosis mas alta es soluble en 250 mL o menos de un medio acuoso en un intervalo de pH de 1-8.

Se estudia el Índice de dosis $D_o = \text{Dosis}/250/S_o$
 S_o , solubilidad de saturación en pH 1-8)

SCB

- Basada en la solubilidad del fármaco y permeabilidad:
 - Caso 1: Alta solubilidad- alta permeabilidad
 - Caso 2 :Baja solubilidad-alta permeabilidad
 - Caso3: Alta solubilidad-baja permeabilidad
 - Caso4: Baja solubilidad-baja permeabilidad
- A estos casos se adiciona la velocidad de disolución (alta a baja en diferentes medios de disolución cosiderando pH 1.5, 4.5 y 6.8)

Disuelve rápidamente

- Condiciones de USP: Cuando se disuelve no menos del 85% de la cantidad de la etiqueta en 30 min.
- Aparato 1 a 100 rpm o aparato 2 a 50 rpm en un vol. De 900 mL o menos en cada uno de los siguientes medios:
- Medio ácido Ej: HCl 0.1N, fluído gástrico sin enzimas (USP).
- Sol. Amortiguadora pH 4.5
- Sol. Amortiguadora pH 6.8 o fluído intestinal sin enzimas.

BCS, caso 1

- Disolución, no velocidad limitante.
- Difusión pasiva, no velocidad limitante
- No se puede medir una velocidad limitante in-vitro
- El significado de correlación in vitro in vivo no es posible.

Caso 2

- La disolución puede ser velocidad limitante
- Difusión pasiva no es velocidad limitante
- Puede medirse una velocidad limitante in vitro
- Es significativo el IVIVC.

Caso 3

- La disolución No es velocidad limitante
- La difusión pasiva puede ser la velocidad limitante
- No puede medirse la velocidad limitante in vitro
- Significado IVVC, probabilidad limitada.

Caso 4

- RETO, fármaco para administración por vía oral
- Grandes probabilidades de que el proyecto no se realice.